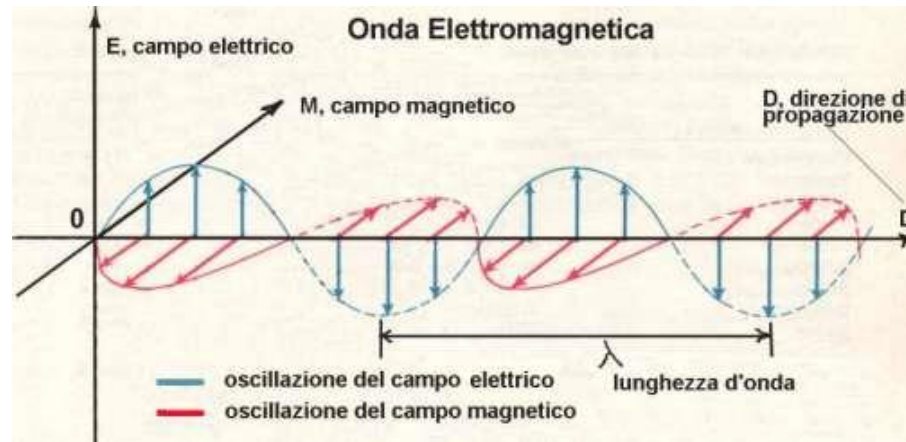


Spettroscopia



Radiazione elettromagnetica: energia che si propaga in un mezzo → fenomeno ondulatorio dovuto alla propagazione simultanea nello spazio di un campo elettrico (E) e di uno magnetico (M) perpendicolari tra loro e oscillanti



Fonte: Internet

Sono generate da una qualsiasi carica (es. elettrone) sottoposta ad accelerazione.

Ogni onda è caratterizzata da diversi valori, tra cui:

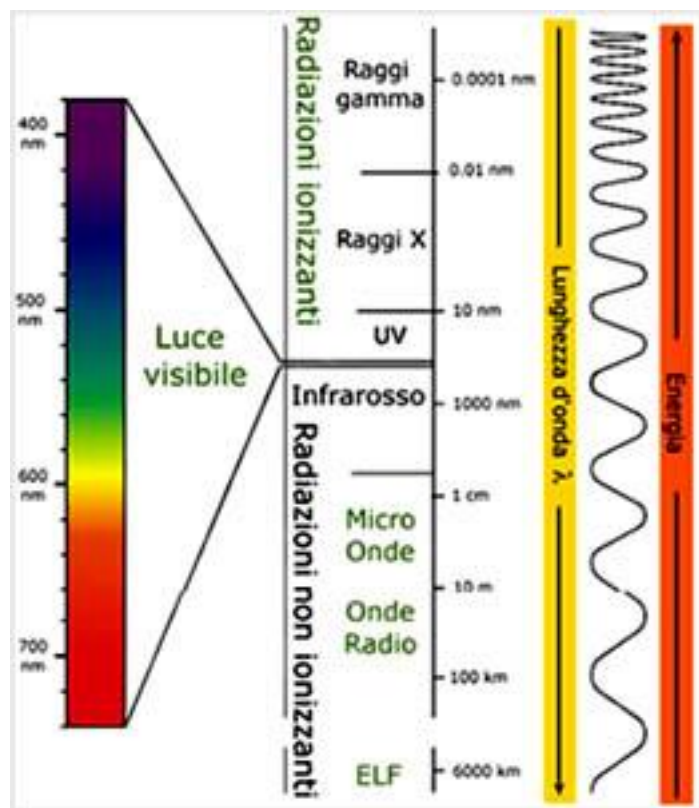
- **Lunghezza d'onda (λ)** → distanza tra due punti in fase tra loro, espressa in nanometri ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$);
- **Frequenza (ν)** → numero di oscillazioni nell'unità di tempo (secondo).

Lunghezza d'onda e frequenza sono legate tra loro da una relazione:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

c = velocità luce = 300000 Km/s
(o $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$)

L'insieme di tutte le radiazioni elettromagnetiche costituisce lo **spettro elettromagnetico**.



Fonte: Internet

La somma di tutte le radiazioni elettromagnetiche visibili corrisponde allo **spettro visibile (380 nm – 780 nm)** → **luce bianca** (o policromatica).

Ogni onda elettromagnetica ha una energia direttamente proporzionale alla frequenza, definita dalla legge di Planck:

$$E = h * \nu = h * \frac{c}{\lambda}$$

dove h = costante di Planck.

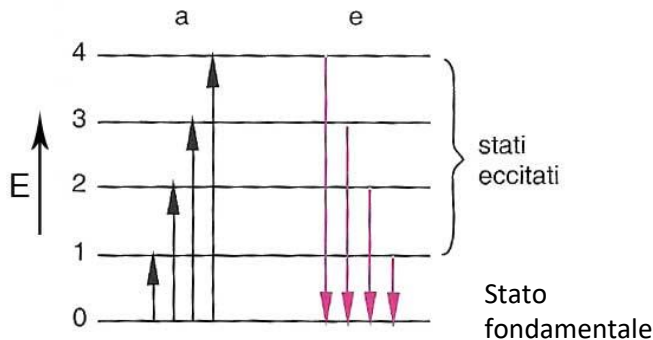
Ogni fotone (elettrone) ha una quantità di energia discreta che dipende dalla frequenza, e quindi dalla lunghezza d'onda, dell'onda associata.

Alta Frequenza = alta Energia oppure, bassa Lunghezza d'Onda = alta Energia

Interazione Radiazione elettromagnetica-Materia

L'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia può portare a:

- *Deviazione della luce da parte della materia* (scattering, riflessione, rifrazione, diffrazione).
- *Assorbimento* → energia trasferita dall'onda alla materia.



Fonte: Principi di Metodologia Biochimica, Ed. Piccin, 2009

Stato fondamentale: livello energetico più basso della molecola (minor energia interna).



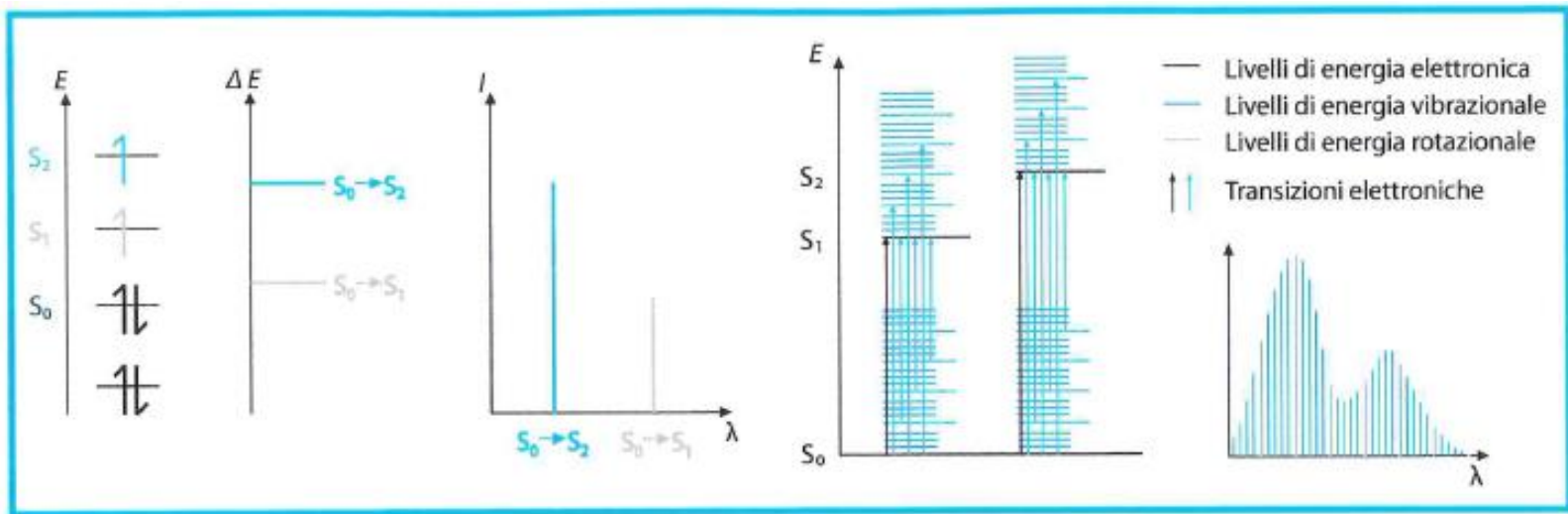
assorbimento



rilassamento

Stato eccitato: livello energetico maggiore ed instabile → ritorno spontaneo allo stato fondamentale.

Le specie chimiche accetteranno quantità determinate di energia, se la transizione è permessa, perché l'energia di una molecola non varia in modo continuo ma per livelli definiti (quantizzata).



Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

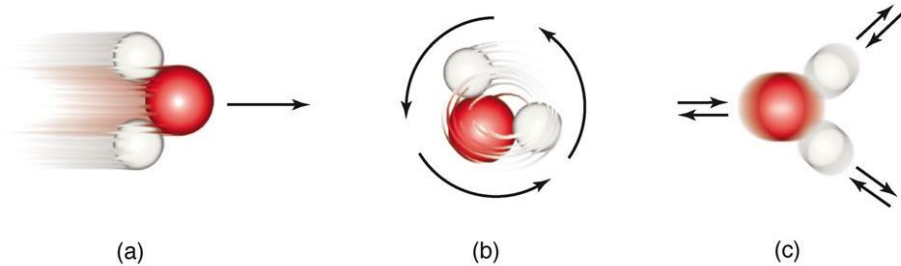


Le transizioni elettroniche singole sono visibili come righe



Le transizioni sono visibili come bande, a causa della presenza di livelli di energia vibrazionale e rotazionale

- a) Moto traslazionale
- b) Moto rotazionale
- c) Moto vibrazionale



Fonte: internet

L'energia utile per una transizione è caratteristica della molecola → hanno effetto solo quelle radiazioni con energia ($h \cdot \nu$) sufficiente a fare il salto energetico.

Spettroscopia di assorbimento UV/Visibile

Valuta l'assorbimento selettivo della radiazione elettromagnetica con lunghezza d'onda compresa tra 10 nm e 780 nm

UV lontano: 10 - 200 nm (poco usato)

UV vicino: 200 - 380 nm

Visibile: 380 - 780 nm

La quantità di energia luminosa assorbita è proporzionale al numero di molecole che la radiazione incontra sul suo cammino → legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} * b * c$$

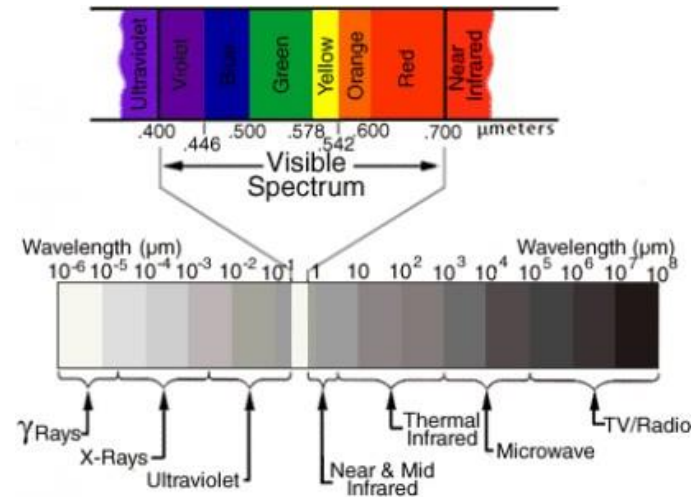
In cui:

A = assorbanza

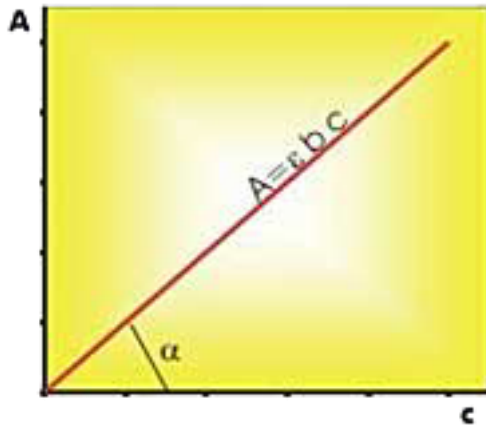
b = cammino ottico (in cm)

c = concentrazione della soluzione

ϵ = coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda considerata



Fonte: Internet



Fonte: Internet

In genere ϵ è unitario e fisso, quindi c'è una proporzionalità diretta tra A e $c \rightarrow$ se mettiamo in grafico si ha una retta!

Il suo coefficiente angolare rappresenta ϵ

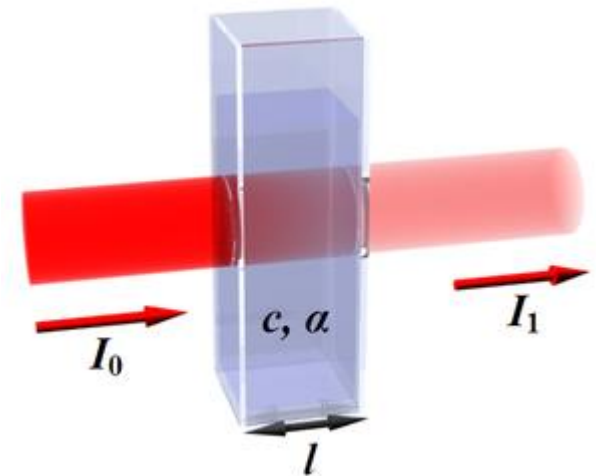
Un'altra grandezza utile per esprimere l'assorbimento è la Trasmittanza $\rightarrow$ rapporto tra luce emergente dal campione (I) e luce incidente (I_0).

$$T = \frac{I}{I_0} \rightarrow \text{in percentuale} \rightarrow T_{\%} = \frac{I}{I_0} * 100$$

Mentre $T\%$ varia da 0 a 100, A può assumere qualsiasi valore > 0 (in genere, però, < 2 o 3 a causa di limitazioni strumentali).

T ed A sono collegate tra loro:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$



Fonte: Internet

Spettrofotometro

Gli strumenti usati per misurare l'assorbimento della luce da parte di soluzioni sono detti **spettrofotometri**.

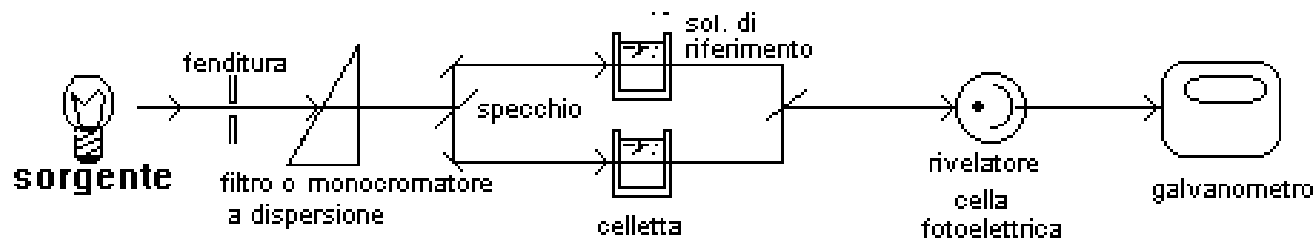
Hanno diversi elementi:

- Sorgente di luce
- Monocromatore
- Compartimento campioni (porta cuvette)
- Rivelatore
- Indicatore del segnale



Fonte: Internet

Schema a blocchi di uno spettrofotometro



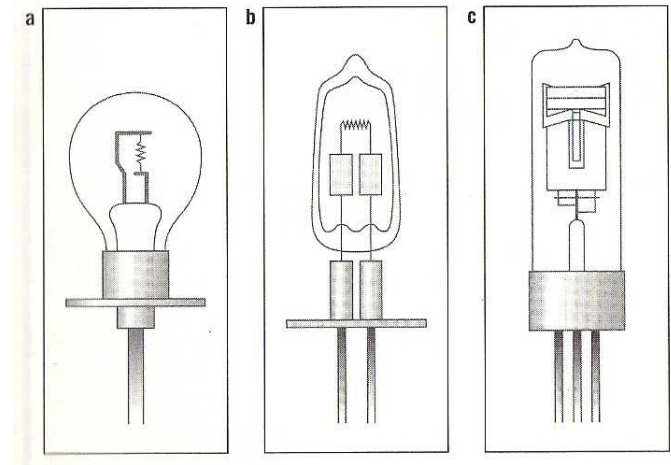
Fonte: Internet

Sorgente di Luce

Le lampade possono emettere nel visibile o nell'UV.

VISIBILE: lampade a filamento di tungsteno (λ 330 nm – 930 nm). Migliori sono le lampade tungsteno-alogeno, con energie più elevate e maggior durata.

UV: lampade al deuterio, in cui il bulbo di quarzo è riempito di deuterio. Emette uno spettro continuo di radiazioni al di sotto dei 400 nm.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

a: lampada tungsteno.

b: lampada tungsteno-alogeno

c: lampada deuterio

I porta-campioni vengono chiamati cuvette. Si usano cuvette diverse a seconda della regione spettrale in cui leggere il campione:

visibile → cuvette di vetro o plastica.

UV → cuvette di quarzo (non assorbono la radiazione UV).



vetro
(OS)



quarzo
(QS)

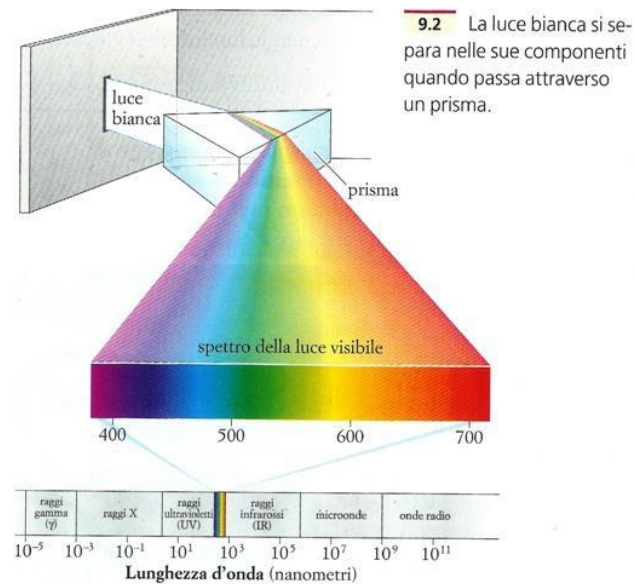
Monocromatori

La luce policromatica viene «scomposta» in luce monocromatica (il più possibile) da un monocromatore.

Luce monocromatica → luce ad una particolare λ

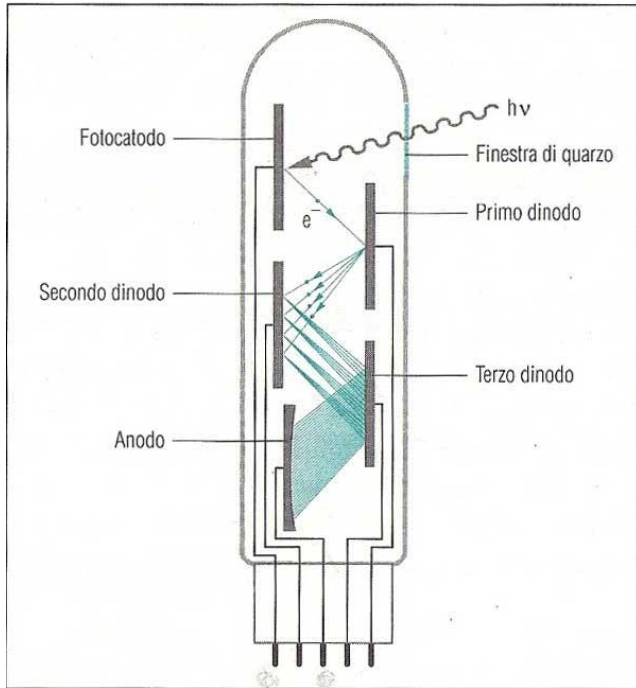
Due tipi principali di monocromatori:

- filtri, assorbono parte della radiazione luminosa, facendo passare quella di interesse.
- prismi e reticoli, separano la luce per rifrazione o diffrazione nelle componenti monocromatiche.



Rivelatore

I più usati (e i migliori) sono i fotomoltiplicatori.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

Funzionamento

Gli elettroni emessi dal catodo illuminato vengono accelerati da un campo elettrico → acquistano energia.

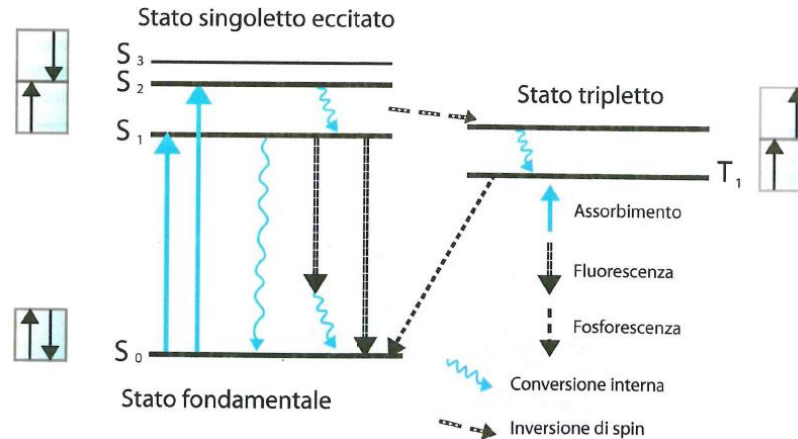
Quando colpiscono un'altra superficie elettronicamente attiva (**dinodo**) liberano elettroni in numero maggiore rispetto a quelli iniziali (sfruttando l'effetto fotoelettrico).

Facendo accadere questi passaggi più volte, si amplifica il segnale: es. dopo 9 passaggi il fotone iniziale è stato amplificato di un fattore 10^6 .

L'uso dei fotomoltiplicatori permette di osservare anche alti assorbimenti della radiazione incidente.

Fluorescenza e fluorimetria

Alcune molecole sono in grado di emettere luce visibile, in seguito ad una eccitazione.



Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

L'assorbimento di un quanto di energia radiante ($h\nu$) porta la molecola dallo stato fondamentale ad uno eccitato.

Lo stato eccitato è instabile → ritorna al livello di partenza disperdendo energia

Una parte di energia assorbita viene persa, mentre una parte viene emessa come luce che possiede perciò una energia minore rispetto a quella usata per l'eccitazione (quindi maggior lunghezza d'onda).

Fluorimetria molecolare → tecnica analitica utile per rivelare quantità piccolissime di sostanza fluorescente. E' **più sensibile della spettrofotometria**.